

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11332577 A**

(43) Date of publication of application: **07 . 12 . 99**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C12Q 1/18

(21) Application number: **10158643**

(22) Date of filing: **25 . 05 . 98**

(71) Applicant: **KAJI AKIRA**

(72) Inventor: **KAJI AKIRA**

(54) **ASSAY OF PROTEIN
TRANSLATION-COMPLETED CONJUGATE
SPLITTING REACTION USING SYNTHETIC MRNA**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a synthetic mRNA to be used as a template in assaying protein translation-completed conjugate splitting reaction so as to elucidate RRF inhibition mechanism, therefore useful in e.g. screening RRF inhibitors.

SOLUTION: This synthetic mRNA which is usable as a

template in assaying protein translation-completed conjugate splitting reaction, has a sequence of UUC AUG UAA. It is preferable that the cooperative operations of factors related to the translation-completed conjugate splitting reaction for proteins such as RRF, EF-G, GTP and RF3 are determined using this synthetic mRNA, and protein translation-completed conjugate splitting inhibitors are produced by screening using this synthetic mRNA.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

PP-1652/KJ (12/17)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-332577

(43) 公開日 平成11年(1999)12月7日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/18		C 1 2 Q 1/18	

審査請求 未請求 請求項の数 9 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平10-158643

(22) 出願日 平成10年(1998)5月25日

(71) 出願人 591188479

梶 昭

東京都東久留米市大門町1丁目1番9号

(72) 発明者 梶 昭

東京都東久留米市大門町1丁目1番9号

(74) 代理人 弁理士 葛和 清司 (外1名)

(54) 【発明の名称】 合成mRNAを用いた蛋白質翻訳終結複合体分解反応の測定方法

(57) 【要約】

【課題】 蛋白質翻訳終結複合体分解阻害剤のランダムスクリーニング等の大量のサンプリング処理に有用で簡便な手段を提供する。

【解決手段】 合成mRNAを用いて蛋白質翻訳終結複合体分解反応を測定する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 蛋白質翻訳終結複合体分解反応の測定にテンプレートとして用いられる合成mRNA。

【請求項2】 UUC AUG UAAの配列を有する合成mRNA。

【請求項3】 請求項1または2に記載された合成mRNAを用いて蛋白質翻訳終結複合体分解反応を測定する方法。

【請求項4】 請求項1または2に記載された合成mRNAを用いてRRF、EF-G、GTP、RF3などの蛋白質翻訳終結複合体分解反応に関連する因子の共同作業を定量的に測定する方法。

【請求項5】 請求項1または2に記載された合成mRNAを用いてRRF阻害を定量的に測定する方法。

【請求項6】 請求項1または2に記載された合成mRNAを用いて蛋白質翻訳終結複合体分解阻害剤をスクリーニングする方法。

【請求項7】 請求項1または2に記載された合成mRNAを用いてRRF阻害剤をスクリーニングする方法。

【請求項8】 請求項1または2に記載された合成mRNAを用いてスクリーニングすることにより、蛋白質翻訳終結複合体分解阻害剤を製造する方法。

【請求項9】 請求項1または2に記載された合成mRNAを用いてスクリーニングすることにより、RRF阻害剤を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、蛋白質翻訳終結複合体分解反応に用いられる合成mRNA、蛋白質翻訳終結複合体分解反応の測定方法及び新規な抗生物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】蛋白質合成は、すべての細胞の生命活動において必要不可欠な機能であり、「開始」、「伸張」、「終結」及び「リボソーム再利用」の四段階から成り立っている。蛋白質合成における最終的なステップ（第4ステップ）は、次の「開始」段階へリボソームを再利用するために、メッセンジャーRNA（以下mRNA）、転移RNA（以下tRNA）、リボソームからなる終結複合体を各々遊離、解離させることにより終了する。これまで、原核生物である大腸菌においては、このリボソームの「再利用」はリボソームリサイクリング因子（Ribosome recycling factor, 以下RRF）とエロンゲーション因子G（elongation factor G, 以下EF-G）により触媒されることが示されてきた。このリボソーム「再利用」の過程はJanosi博士らによる総説（1996 Adv. Biophys. 32:121-201）において紹介されている。

【0003】近年、従来の抗生物質への耐性獲得菌株が数多く報告されてきており、細菌の発育を直接的に制限

し得る部位を標的とする、新たな抗生物質の開発が早急に必要とされている。蛋白質翻訳終結複合体の分解、すなわちリボソーム再利用は、細菌にとって必要不可欠な機能であり、すなわちこの機能阻害が今後抗生物質の良き標的対象となり得ることが期待されている。そのため、この機能測定法は産業上非常に重要なものであるといえる。

【0004】従来行なわれてきたこの蛋白質翻訳終結複合体分解能、すなわちリボソーム再利用の活性を測定する方法は、活発に発育している細菌より精製した、mRNAと翻訳中の数個のリボソームそしてペプチジルtRNAからなる「天然」のポリソームをそのテンプレートとし、RRF、EF-G、GTPの必須因子存在下において反応を行なうもので、その際にポリソームより解離する70Sリボソーム（モノソーム）を測定、計算し蛋白質翻訳複合体分解能としている。すなわち、上記に示したような今後期待されるこの機能の阻害剤は、この70Sリボソームの解離を阻害するものとなる。しかし同時に、この方法は、今後期待される蛋白質翻訳終結複合体分解阻害剤の発見、特にランダムスクリーニング等の大量のサンプル処理を要求する目的には必ずしも都合のよいものとはいえない。その理由として、一度に大量のサンプルを取り扱えない、天然のポリソームの精製が比較的難しく且つ常に安定した活性を持つものを得難い、実験の性質上半定量的なものにならざるを得ないなどの点が挙げられる。

【0005】一方、インビトロにおいて蛋白質翻訳終結、すなわち翻訳されたペプチド鎖解離に関与する因子としてリリースファクター3（以下RF3）が知られており（Goldsteinら, 1970, Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 65, 430-437及び、Goldsteinら, 1970, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 537-543）、これはGTP結合部位を持つ因子である。これまで、37℃で発育する大腸菌において、RF3は必須の因子ではないことが示されている（Grentzmannら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5848-5852及びMikuniら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9, 5798-5802）。また、蛋白質翻訳終結複合体の分解、すなわちリボソーム再利用に必須の一因子であることが古くから知られているEF-G（Hirashima and Kaji, 1972, Biochemistry, 11, 4037-4044）においても、GTPase活性が認められており（Conway and Lipmann, 1964, Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 52, 1462-1469）、この反応は蛋白質合成翻訳終結複合体の分解に必須の反応であることが知られている。しかしながら、このような因子がRRFとの共同作業において、あるいは蛋白質合成翻訳終結複合体分解反応において、どのように機能しているかについては現在のところ解明されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、蛋白

質翻訳終結複合体分解阻害剤のランダムスクリーニング等の大量のサンプリング処理に有用で簡便な手段を提供することにある。また本発明の課題は、蛋白質翻訳終結複合体分解反応にとって重要なEF-G、RF3、GTPなどの因子のRRFとの共同作業におけるメカニズム、更にはRRF阻害のメカニズムの解明を基礎として、RRF阻害剤の有用なスクリーニング手段を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者が上記の課題を解決するために、鋭意研究を重ねる中で、全く意外にも、蛋白質翻訳終結複合体を構成するmRNAに放射標識した短い合成mRNAをテンプレートとして用いることにより、従来の測定法における問題点を解決できるとの知見を得た。RRFは合成ヌクレオチドの代表であるポリUではその機能を発揮し得ず、一般に自然界に存在するmRNAでなければ反応の測定は不可能とされていたことからすると、この知見は、その概念を覆す画期的なものといえる。さらに本発明者は、上記合成mRNAの発見とともに、この合成mRNAを用いたアッセイ系において、EF-Gと同様にGTPase活性を持つRF3においても、蛋白質翻訳終結複合体分解の機能が得られるであろうという仮説のもと、従来知られていたコファクターであるEF-Gの代りに、リリースファクター3（以下RF3）をコファクターとして用いたところ、翻訳を終えたリボソームの再生において、翻訳終止に関与するRF3がRRFと共同して作業していること、したがって究極的には、RRF阻害剤はRRFがRF3と共同して行う作業を阻害する物質でもあり得ること、といった新規知見を得ることができた。即ち、RF3をEF-Gの代わりに用いることでも、EF-Gと同様の機能、つまりRRF、GTP存在下における蛋白質翻訳終結複合体の分解およびリボソームの再利用を惹起できることが分かった。

【0008】これらの知見に基づき本発明者はさらに研究を進めた結果、リボソーム再利用の活性の、全く新しい測定手段およびスクリーニング手段を示す本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち本発明は、蛋白質翻訳終結複合体分解反応の測定にテンプレートとして用いられる合成mRNAに関する。また本発明は、該合成mRNAを用いた蛋白質翻訳終結複合体分解反応の測定方法に関する。さらに本発明は、該合成mRNAを用いてRRF、EF-G、GTP、RF3などの蛋白質翻訳終結複合体分解反応に関連する因子の共同作業を定量的に測定する方法、およびRRF阻害を定量的に測定する方法に関する。また本発明は、該合成mRNAを用いた蛋白質翻訳終結複合体分解阻害剤およびRRF阻害剤をスクリーニングする方法に関する。さらにまた本発明は、該合成mRNAを用いてスクリーニングすることにより、蛋白質

翻訳終結複合体分解阻害剤およびRRF阻害剤を製造する方法にも関する。

【0010】本発明による合成mRNA及びこれを用いたスクリーニング方法は、高能率スクリーニング機（HTSシステム）に適用可能であることから、大量のサンプル処理を可能とし、産業上極めて大きな意義を有するものである。以下の実験例において、RF3の関与した蛋白質翻訳終結複合体分解反応測定法についての詳細を示す。ただし、本発明は、これ等の実験例の記載により制限されるべきものでないことはいうまでもない。

【0011】

【実験例】実験例1 アッセイ系の構築

35S標識ホルミルメチオニルtRNAと32P標識UUC AUG UAA 合成mRNAからなる蛋白質翻訳終結複合体は以下のように作製した。すなわち、20mM Tris pH7.2、150mM NH₄Cl、30mM Mg(OAc)₂を含む50μlの緩衝液中において、300ピコモルの70Sリボソームと300ピコモルのcharged tRNAを500ピコモルの5' [32P] RNA-oligonucleotide (Sambrookら, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) 存在下で20分間、30℃でインキュベートして結合させ、非結合mRNAとtRNAをセファクリルS-300スピンカラム (Pharmacia) で4℃において除去し精製した。蛋白質翻訳終結複合体分解反応は、8mM Tris、pH7.2、40mM NH₄Cl、8mM Mg(OAc)₂からなる50μlの緩衝液 (Ogawa and Kaji, 1975, Eur. J. Biochem., 58, 411-419) 中において、RF2もしくはRF1、RF3もしくはEF-G、RRF、GTP 160マイクロモラーを加えて30℃で行った。RF3を用いる方法においては、EF-Gを用いた際にリボソーム再利用活性を増強させることが示されている0.2ミリモラーのphosphoenolpyruvateと3μgのpyruvate kinaseの添加は、必須ではなかった。また、RF3がEF-Gの機能を代替することを確認するために、RF3のdose-dependenceカーブを構築した。加水分解したホルミルメチオニンの測定は未反応のホルミルメチオニルtRNAのエチルアセテートによる抽出後に行い、解離したmRNAの測定は4℃でMicrocon10フィルター (Amicon) を通過させた後に行った。解離の未反応ホルミルメチオニルtRNAは、セファクリルS-300スピンカラムによる再精製を行った後、35Sのカウントをそれとした。すべての実験は、別の系において、2回もしくは4回行ったものを結果とした。尚、この実験では9ヌクレオチドを用いているが本発明は必ずしも数により制限されるものではない。

【0012】実験例2 RF3、RRF、GTPによる蛋白質翻訳終結複合体の分解能を見た実験

表 1 に示す様に、これまでこのリボソーム再利用における蛋白質翻訳終結複合体分解能の確認に用いられてきた、テンプレートとして天然の mRNA を使用する方法ではなく、本発明により初めて示される、合成 mRNA (以下 *mRNA) を用いたことは産業上極めて重要である。しかも従来記載されているショ糖勾配遠心分離法でなく、アミコン 10 フィルターを用いることにより多くの検体を短時間で処理できる。従来の鎖長の長い天然の mRNA を用いる方法ではフィルターに mRNA がつきやすく定量的な測定は無理であったが、短い合成 RNA を用いた本願の発明において初めて、この RRF 活性が極めて簡単且つ迅速にアッセイ可能となった。従って本発明は RRF 阻害剤のスクリーニングには極めて重要で産業上の意義は深い。

【0013】更に、上記に述べた如く RRF 3 が EF-G 同様に GTPase 活性を有するという事実より、この RRF 3 が EF-G に代わり、RRF、GTP 存在下における蛋白質翻訳終結複合体の分解およびリボソームの再利用を触媒し得ることを確かめた実験例を表 1 に示す。具体的には上記記載の方法について記した通り、それぞれ RRF 1 もしくは RRF 2、RF 3 もしくは EF-G、さらに RRF と GTP の存在、非存在下における、リボソームからの蛋白質翻訳終結複合体からの 32P 標識 UUA AUG UAA *mRNA の解離 (表 1 の A) もしくは 35S 標識ホルミルメチオニン (以下 *fmet) と非加水分解解離 35S 標識ホルミルメチオニル tRNA (以下 *fmet-tRNA) の解離 (表 1 の B) をカウントした。

【0014】始めに、本発明により初めて実施される *mRNA を用いた試験が有効であるか否かを比較検討し確認した結果が 表 1 の A の 1 列目と 6 列目である。すなわち、RF 2 の存在により蛋白質翻訳が終結され、それに引き続いて EF-G、RRF、GTP により蛋白質翻訳終結複合体の分解が行なわれ *mRNA がリボソームより解離するのが確認できる。これまで示されてきたように、この過程には EF-G が必須であり (表 1 の A 1 列目)、EF-G 非存在下においてはその分解は認められない (同 A 6 列目)。

【0015】次に、この方法を用いて RRF 3 が EF-G の機能を代替できるか否かを見た (同 A)。RF 2 による蛋白質翻訳終了後においては、RF 3 と RRF、GTP により *mRNA のリボソームよりの解離が確認され、蛋白質翻訳終結複合体の分解が認められた (同 A 2 列目)。この活性は GTP の存在に依存しており (同 A 2 列目と 3 列目を比較)、対照として用いた GDP 存在下では認められなかった (同 A 4 列目)。当然ながら、RRF (同 A 5 列目) と RF 3 (同 A 6 列目) の存在に依存してしていることも確認された。

【0016】それに対して、蛋白質翻訳の終了に RF 1 を用いた場合には RF 3 と RRF、GTP の全ての因子

存在下においても *mRNA のリボソームよりの解離はあまりよく起らなかった (同 A 7 列目と 9 列目を比較)。しかしその後の解析により、この RF 1 はそれ自身でこの *mRNA とリボソームの両者に結合することがわかり、更にこの *mRNA への結合は非放射標識の mRNA (以下 n. r. mRNA) で競合阻害できることが確認された。そこでこの n. r. mRNA を同時に用いて反応させることにより、RF 1 を用いて行なう系においても EF-G の代りに RF 3 が *mRNA のリボソームよりの解離、すなわち蛋白質翻訳終結複合体の分解を行うことを確認した (同 A 7 列目と 9 列目の + n. r. RNA を比較)。ここに示した様に、RF 1 をその蛋白質翻訳終結因子として用いた際に、解離 *mRNA の再結合による偽陰性を防ぐため、非標識の mRNA を加えて反応を行なうことが有効である。

【0017】上記に示された RRF 3 及び RRF、GTP による *mRNA のリボソームよりの解離は、RF 1 及び RF 2 の非存在下においても認められた (同 A 10 列目)。この RF 1 及び RF 2 非存在下における *mRNA のリボソームよりの解離においても、GTP (同 A 11 列目) RRF (同 A 12 列目) RF 3 (同 A 13 列目) の存在に依存していることを確認した。すなわち、RF 1 及び RF 2 の蛋白質翻訳終結因子を含まずに終結複合体の分解を行なう系も本発明に属するものである。

【0018】上に示されたようなペプチチル tRNA の加水分解を伴わない条件での *mRNA のリボソームよりの解離に関する現象は、既知の EF-G、RRF によるリボソーム再利用の反応とは異なるものである。すなわち、表 1 の B 1 から 9 列目において、*fmet の解離が常に行われ、fmet tRNA の解離が見られないのに対して、同 B 10 列目に見られるように RF 1 および RF 2 非存在下における蛋白質翻訳終結複合体の分解の際には解離の *fmet-tRNA が認められ、この系においては fmet-tRNA の加水分解が起らなくとも mRNA の解離が行える事実が示された。このような RF 1 および RF 2 非存在下における RF 3、RRF、GTP による蛋白質翻訳終結複合体の分解は、インビボ内での実際の現象としては非常に稀なものであると思われる。しかし一方で、RRF のアッセイに関してこの系は使用出来るのでこの意味では産業上重要である。RRF の阻害剤のスクリーニングを実施する上で、従来の EF-G と RRF を用いる方法では当然のことながら EF-G の阻害剤、例えばフシジン酸はあたかも RRF の反応を阻害するように見えるので、真の RRF 阻害剤をスクリーニングするには適さない。RF 3 の阻害剤は現在の所知られていないので、RRF に特異的な阻害剤のスクリーニングは RF 3 を用いた方がより好ましい場合もあり得る。

【0019】実験例 3 RF 3 の蛋白合成終結複合体

10

20

30

40

50

分解への関与を示す実験

上記実験例の通り、今日までに示されてきたような EF-G、RRF、GTP を用いる系ではなく、EF-G の代わりに RF 3 を用いる系においても蛋白合成終結複合体の分解が行なえることが確認されたが、さらにこの現象の発見をより確実に証明するため、蛋白合成終結複合体における RF 3 の濃度依存を確認した実験例を図 1 に記す。RRF の濃度は表 1 に比べ低濃度で行い、RF 2 の存在、又は非存在下において行った。EF-G が完全に存在しないこの系において、RF 3 の濃度に依存してリボソームから *mRNA の解離が増加しているのが観察できる。すなわち、RRF による蛋白質翻訳終結複合体の分解において、これまではその反応に必須とされてきた EF-G に代わり、RF 3 がその機能を担えることが証明された。また、この表 1 の実験例に比べ低濃度の RRF を用いる系においては、この反応は RF 2 の存在に依存しており、例えば非常に高濃度の RF 3 (0.22 ユニット) を用いても RF 2 非存在下においては、*mRNA を解離する活性は殆ど認められない。すなわちこの条件が自然の終結反応に一番近い条件であると考えられる。

【0020】またこれまでの知見で、この蛋白質翻訳終結複合体の分解には RRF が必須のものであることが示されている。そこで同様に、この RF 3 を用いたリボソームリサイクリングの反応系において、RRF の濃度依存を確認した実験例を図 2 に記す。その結果から、この系においてもやはり確かに RRF の濃度に依存して蛋白質翻訳終結複合体の分解、すなわちリボソームのリサイクリングが行なわれていることが確認できる。この系は従って RRF 阻害剤のスクリーニングに実用上使用することができる。

【0021】

【発明の効果】上記に示した実験例により、EF-G と同様に GTPase 活性を持つ RF 3 においても、蛋白質翻訳終結複合体分解の機能が得られるであろうという仮説が証明された。RF 3 と GTP により RF 1 もしくは RF 2 の終結因子がリボソームの A 部位より放出され、同時に終結 tRNA の E 部位への移動、すなわち本

来 EF-G が「伸展」の際に行っている機能を担うことが確認され、蛋白質翻訳終結複合体分解の活性測定の新たな方法として、EF-G の代わりに RF 3 を用いた実施法が証明された。

【0022】前述の、従来行なわれてきたリボソーム再利用、蛋白質翻訳終結複合体分解の活性を測定する方法は、天然のポリソームを用いて解離する 70S リボソームを測定、計算するものであるが、その天然の mRNA からなるポリソーム精製の技術的な煩雑さは、本発明による合成 mRNA をテンプレートとして用いる方法により解消されるものであり、今後産業的価値が非常に高いこの機能の阻害剤を同定する際に、一定の同じ活性を持つテンプレートとして使用できることが期待される。また従来の方法の 70S リボソーム量測定法では、ショ糖勾配による超遠心分離を行うことが必要であり、そのローターの制限により一度に 6 本の検体しか取り扱えなかったが、本発明はこの欠点を充分補うものである。更に、これまでの 70S リボソーム量測定法では、その解析法の性質から半定量的なものにならざるを得なかったが、本発明はその放射活性を比較しているものであり、定量的な解析が行えるものである。加えて合成 mRNA は必ずしも放射性ラベルを用いる必要はなく、例えばジゴキシゲニン等でラベルし解離 mRNA を呈色反応で測定すればハイスループットスクリーニングシステムに組み込んで多くの化合物を RRF 阻害剤としてスクリーニングできる。また本発明の合成 mRNA でも RRF のアッセイが可能であることが確立されたので次の応用が可能である。つまり、ポリ U に終止コドンをつけ、その下流に一定のアミノ酸、例えばヒスチジンポリマーをコードするような核酸配列を配置すれば mRNA の解離でなく、RRF の阻害されたことにより mRNA の下流が翻訳されることを利用したインビボアッセイ (本出願人による、特願平 10-14747 号) と並び、インビトロの RRF 活性のアッセイをトランレイションで見るとも可能であり、産業上の意義は大きい。

【0023】

【表 1】 [表 1] RRF 存在下における EF-G もしくは RF 3 によるリボソーム再利用を比較した実験例

加えられる因子	A		B	
	*mRNA	*mRNA (+n. r. RNA)	*fmet	*fmet- tRNA
	の解離		の解離	

⁹			¹⁰
1) RF2, EF-G, GTP, RRF	70	57	9
2) RF2, RF3, GTP, RRF	60	60	
3) RF2, RF3, RRF	10	64	
4) RF2, RF3, GDP, RRF	17	67	n. d.
5) RF2, RF3, GTP	14	70	
6) RF2, GTP, RRF	8	68	
7) RF1, RF3, GTP, RRF	5	20	48
8) RF1, RF3, GTP	1	5	38
9) RF1, GTP, RRF	0	1	36
10) RF3, GTP, RRF	48	4	41
11) RF3, RRF	1	4	1
12) RF3, GTP	6	2	5
13) GTP, RRF	2	2	1

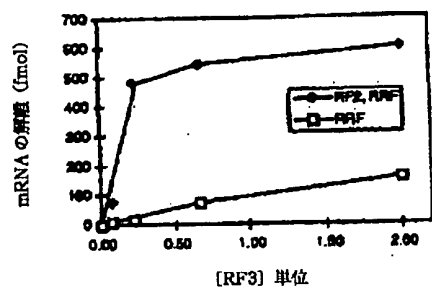
【0024】RF1もしくはRF2、RF3もしくはEF-G、RRFとGTPのそれぞれ存在、非存在下における蛋白翻訳（合成）の終結とリボソーム再利用に伴う[32P]標識合成mRNA（*mRNA）のリボソームよりの解離（A）、もしくは[35S]標識ホルミルメチオニン（以下*fmet）と解離[35S]標識ホルミルメチオニルtRNA（以下*fmet-tRNA）のリボソームよりの解離（B）をカウントして表記した。7、8、9列目のRF1を用いた系列では、ribosomeの再利用後標識mRNAにRF1が再結合しそのカウントが見れなくなるのを防ぐため、1ナノモルの非標識mRNAを加えた。RF2 200ピコユニットもしくはRF1 40ピコユニット、RF3 5ユニットもしくはEF-G 12ピコモル、RRF 6ピコモル、GTP 160マイクロモラーもしくはGDP 160マイクロモラーをそれぞれ含む50 μ lの溶液中において、35S標識ホルミルメチオニルtRNAと32P標識UUC AUG UAA 合成メッセンジャーRNAからなる1ピコモルの蛋白質翻訳終結複合体を30℃、10分インキュベートした。1列目においては、EF-G 0.2ミリモラー、ビルビンキナーゼ 3 μ gを加えた（Ogawa and Kaji, 1975, Eur. J. Biochem., 58, 411-419より）。表記のリボソームより解離したmRNAとfmetの濃度は100分の1ピコモルで表し、各因子抜きで行った空試験から得た150フェトモルのmRNAと50フェトモルのfmetをそれぞれ控除して表記した。各値の標準偏差はすべて5から15%以内であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 RF2存在において、RF3、RRF、GTPによる蛋白質合成翻訳終結複体の分解がRF3濃度依存であることを示すグラフ。RRF 2ピコモル、GTP 160 μ Mを含む50 μ lの溶液中において、100ピコユニットのRF2存在、非存在下で図中に示す濃度のRF3を用いて35S標識ホルミルメチオニルtRNAと32P標識 UUC AUG UAA合成メッセンジャーRNAからなる1ピコモルの蛋白質翻訳終結複体を30℃、10分インキュベートし、解離したmRNAを縦軸にとり図示した。解離したmRNAはフェトモル単位で表し、横軸には反応液中に含まれるRF3の濃度をユニット単位で表した。RF3、RRF共に非存在下における空試験から得た150フェトモルのmRNAを控除して表記した。

【図2】 RF3、RRF、GTPによる蛋白質合成翻訳終結複体の分解がRRF濃度依存であることを示すグラフ。RF3 1ユニット、GTP 160 μ Mを含む50 μ lの溶液（8mM Tris, pH7.2, 40mM NH₄Cl, 8mM Mg(OAc)₂）中において、図中に示す濃度のRRFを用いて35S標識ホルミルメチオニルtRNAと32P標識 UUC AUG UAA 合成メッセンジャーRNAからなる1ピコモルの蛋白質翻訳終結複体を30℃、10分インキュベートし、解離したmRNAを縦軸にとり図示した。解離したmRNAはフェトモル単位で表し、横軸には反応液中に含まれるRRFの濃度をピコモル単位で表した。RF3、RRF共に非存在下における空試験から得た150フェトモルのmRNAを控除して表記した。

【図 1】



【図 2】

